



**T.C.SAĞLIK BAKANLIĞI**  
**ANKARA ATATÜRK EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ**  
**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ KLİNİĞİ**

**DIYABETİK SIÇANLARDA YAĞ DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN**  
**STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN SİYATİK SİNİR**  
**İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Uzmanlık Tezi**  
**Dr. Berrak AKŞAM**

**Ankara, 2014**

**T.C.SAĞLIK BAKANLIĞI**  
**ANKARA ATATÜRK EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ**  
**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ KLİNİĞİ**

**DİYABETİK SIÇANLARDA YAĞ DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN**  
**STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN SİYATİK SİNİR**  
**İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Uzmanlık Tezi**  
**Dr. Berrak AKŞAM**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Mustafa Erol DEMİRSEREN**

**Ankara, 2014**

## ÖNSÖZ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi asistanlığım süresince yetişmemde büyük emeği olan; bilgi, beceri ve tecrübelerinden hayatım boyunca faydalanacağım değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Erol Demirseren'e sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Eğitimimin temellerini atmamda çok büyük katkı sağlayan, düşünce ve davranışlarını her zaman örnek aldığım Op. Dr. Ergin Seven'e; eğitimimin değişik aşamalarında bana yol gösteren Op. Dr. Cemil Özerk Demiralp, Op. Dr. Ahmet Işıkdemir, Op. Dr. Candemir Ceran ve Op. Dr. Fatma Betül Ak Bozkırlı'ya şükranlarımı sunarım.

Tüm bilgi birikimini sabırla aktaran, her türlü sorunumda ulaşabildiğim kıdemlilerim Op. Dr. Kamran Efendioğlu ve Op. Dr. Nihal İşleyen'e; birlikte fedakarca çalışmaktan zevk aldığım Dr. Çağla Çiçek, Dr. Soner Tezcan ve Dr. Hüsnü Hacı'ya; tüm hemşirelere ve yardımcı sağlık personeline teşekkürlerimi sunarım.

Bu deneysel çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan Doç. Dr. Fatma Duygu Özel Demiralp'e, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Seçil Karahisar Turan'a, kısıtlı zamanında bana hep yardımcı olan Patoloji hocam Prof. Dr. Esra Erden'e saygılarımı sunarım.

Asistanlık eğitimimin sonuna kadar tüm desteği ile yanımda olan, her zorluğu beraber aştığımız, tüm öğrendiklerimizi paylaştığımız eşim ve eş kıdemlim Ersin Akşam'a, her zaman yanımda olan kardeşime ve her zaman yanımda hissettiğim anneme, doktor olmamda en büyük katkısı olan, bana insanlığı öğreten akıl hocam, babam, Prof. Dr. Oktay Karatan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Berrak Akşam

Ankara, 2014

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLolar, ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ .....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	vi
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1 Giriş.....	1
1.2 Sinir Sistemi Organizasyonu .....	2
1.3 Periferik Sinir Anatomisi.....	3
1.4 Periferik Sinir Sistemi Yapısı.....	4
1.5 Diabetes Mellitus.....	5
1.6 Diyabetik Nöropati .....	6
1.7 Yağ Dokusu ve Stromal Vasküler Fraksiyon .....	10
1.8 Deneysel Hayvan Modelleri .....	13
1.8.1 Diyabetik Hayvan Modelleri .....	14
1.8.2 Diyabetik Nöropati Modelleri ve Nöropatinin Değerlendirilmesi.....	15
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3. BULGULAR.....	22
3.1 Yürüme Yolu Analizi .....	22
3.2 Elektromiyografi Analizi.....	23
3.3 Histopatolojik Analiz .....	23
4. TARTIŞMA .....	26
5. SONUÇ .....	32
6. KAYNAKLAR .....	33
ÖZGEÇMİŞ .....	36

## ÖZET

### Giriş

Bu çalışmada streptozotosin ile diyabetik hale getirilen sıçanlarda, inguinal yağ dokusundan elde edilen stromal vasküler fraksiyon, siyatik sinire enjekte edildi ve stromal vasküler fraksiyonun siyatik sinir nöropatisi üzerine etkileri, fonksiyonel, elektrofizyolojik ve histopatolojik olarak incelendi.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmada sıçanlar; kontrol grubu (n=8), adipoz dokudan stromal vasküler fraksiyon elde edilen diyabetik grup (n=8), diyabetik kontrol grubu (n=8), siyatik sinire fosfat tamponlu salin enjekte edilen diyabetik grup (n=10), siyatik sinire stromal vasküler fraksiyon enjekte edilen diyabetik grup (n=10) olarak 5 gruba ayrıldı. Deneyin başlangıcında gruplara elektromiyografi ve yürüme yolu analizi yapılmasını takiben diyabetik olarak planlanan gruplara tek doz streptozotosin uygulandı. Sekizinci haftada yürüme yolu ve elektromiyografi ölçümleri yinelendi. Sekiz diyabetik sıçanın adipoz dokusundan stromal vasküler fraksiyon elde edilerek 10 adet sıçanın sağ siyatik sinir bölgesine enjekte edildi. Diğer deney grubunun sağ siyatik sinirine ise fosfat tamponlu salin enjekte edildi. Onikinci haftada yürüme yolu analizi ve elektromiyografi tekrarlandı, deney sonlandırılarak siyatik sinirler histopatolojik olarak incelendi.

### Bulgular

Yürüme yolu analizinde stromal vasküler fraksiyon enjekte edilen grubun siyatik sinir indeksinin düzeldiği, histopatolojik olarak sağ siyatik sinirin miyelin kalınlığının hem aynı sıçanların sol siyatik sinirine hem de diyabetik kontrol grubuna göre kalın olduğu, miyelin hasarının daha az olduğu, sinir liflerinin sayısı ve çapının daha fazla olduğu görüldü. Elektromiyografik ölçümlerde istatistiksel olarak fark saptanmadı.

### Sonuç

Diyabetik nöropati tedavisinde adipoz dokudan elde edilen, kök hücreden zengin stromal vasküler fraksiyonun sinirlere uygulanması, sinir hasarının düzeltilmesinde yarar sağlayabilecek bir yöntemdir.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabetik Nöropati, Adipoz Doku, Stromal Vasküler Fraksiyon, Siyatik Sinir

## ABSTRACT

### Introduction

In this study, effects of adipose derived stromal vascular fraction in diabetic neuropathy were investigated in diabetic rat model with functional, electrophysiologic and histopathologic analysis.

### Materials and Methods

Fourty four rats were divided into five groups as control group (n=8), diabetic rat group that were used to get stromal vascular fraction (n=8), diabetic control group (n=8), diabetic rat group that were injected phosphate buffered saline at their sciatic nerve (n=10), diabetic rat group that were injected stromal vascular fraction at their sciatic nerve (n=10). In the beginning of the experiment, electromyography and walking track analysis were done to all groups. Streptozotocin was injected to the groups that are planned to be diabetic. After 8 weeks, electromyography and walking track analysis were done, stromal vascular fraction from inguinal fat pads were collected from 8 diabetic rats, stromal vascular fraction and phosphate buffered saline were applied to right sciatic nerves to the experiment groups. At 12<sup>th</sup> week, electromyography and walking track analysis were done again, experiment was terminated and all sciatic nerves were sent to histopatological examination.

### Results

In the diabetic rat group that were injected stromal vascular fraction at their sciatic nerve, sciatic functional index in 12<sup>th</sup> week were better than 8<sup>th</sup> week. Histopatologically, their right myelin sheath of sciatic nerve were thicker, more uniform and nerve fibers were thicker than left side. There was no statistically different parameters in electromyigraphy between groups.

### Conclusion

Adipose drevide stromal vascular fraction may be beneficial for nerve regeneration in diabetic neuropathy.

**Key Words:** Diabetic Neuropathy, Adipose Tissue, Stromal Vascular Fraction, Sciatic Nerve

## TABLolar, ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Tablo 1: Sinir Sistemi Yapısı .....	2
Tablo 2: Sinir Sistemi Organizasyonu .....	3
Tablo 3: Duyu nörönlarının alt grupları .....	4
Tablo 4: Diabetes Mellitus Sınıflandırması .....	5
Tablo 5: Thomas Diyabetik Nöropati Sınıflandırması.....	8
Tablo 6: Diyabetik Nöropati Klinik Sınıflandırması .....	9
Tablo 7: İnsan Adipoz Kökenli Kök Hücre İmmünfenotipi .....	12
Tablo 8: Diyabetik Deney Hayvanı Modellerine Örnekler.....	15
Tablo 9: Deney Şeması .....	18
Tablo 10: Yürüme Yolu Analizi .....	22
Şekil 1: Nörönun Yapısı.....	3
Şekil 2: Sinir Lifinin Yapısı .....	4
Şekil 3: Siyatik Fonksiyon İndeksi Formülü.....	19
Resim 1: Elektromiyografi Kayıtları.....	18
Resim 2: Yürüme Yolu .....	19
Resim 3: Sıçan Ayak İzi.....	19
Resim 4: İnguinal Yağ Yastıkçığıının Diseksiyonu.....	20
Resim 5: Siyatik Sinire Enjeksiyon .....	20
Resim 6: Histopatolojik Analiz, Luksol Fast Boyama.....	25

## SİMGELER ve KISALTMALAR

Diabetes Mellitus	DM
Stromal Vasküler Fraksiyon	SVF
Fosfat Tamponlu Salin	FTS
Elektromiyografi	EMG





# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1 Giriş

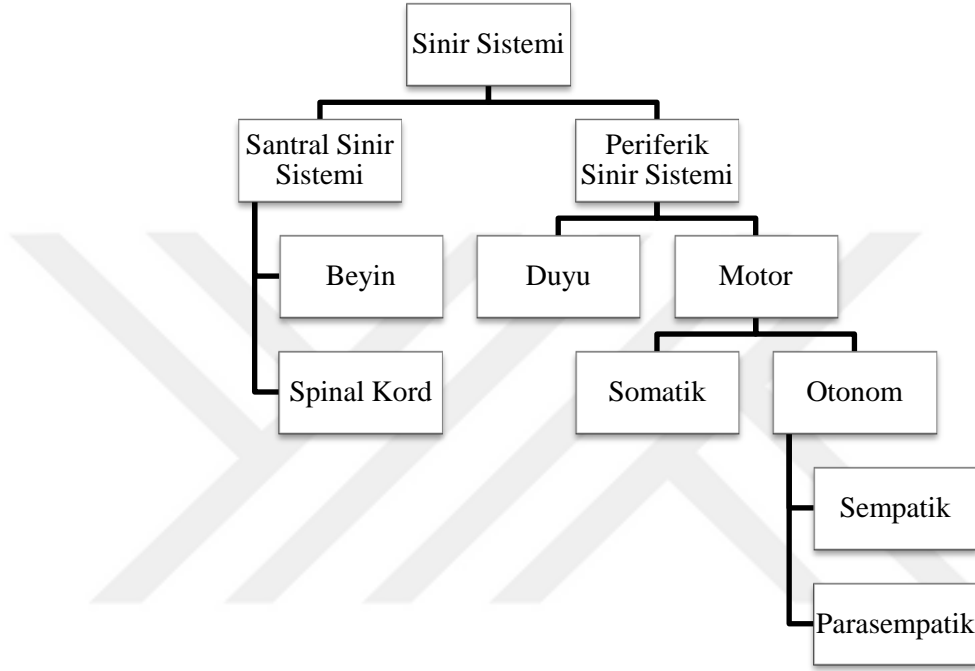
Diabetes Mellitus (DM) 21. yüzyılın en zorlu hastalıklarından biri olarak kabul edilmektedir. Tüm dünyada bugün için yaklaşık 382 milyon insanı etkilemektedir. Bu sayının 2035 yılında 592 milyona çıkacağı öngörülmektedir (1). Hastalığın komplikasyonları ciddi morbidite ve mortaliteye yol açarak, sağlık sistemlerine önemli mali yükler getirmektedir. Hayat kalitesinin düşmesine ve maluliyete sebep olan komplikasyonlar arasında periferik nöropati; tüm diyabetik hastaların %50'sini, yaşlı diyabetik hastaların yaklaşık %70'ini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur (2).

Diyabetik nöropatinin etiyojisi ve tedavisi ile ilgili birçok deneysel ve klinik çalışma mevcuttur. Literatürde, streptozotosin ile diyabetik hale getirilmiş sıçanlar, nöropati araştırmaları için uygun bir model olarak sunulmuştur (3). Multifaktöryel etiyojisi olan periferik nöropati tedavisinde antioksidanların kullanılması ile sıçan yürüme fonksiyonlarının düzeldiği ve nöropatiye bağlı ağrıların azaldığı gösterilmiştir (3). Antioksidanların yanı sıra, büyüme faktörü ve kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin diyabetik nöropatik sıçanlarda sinir liflerinin yapısını düzelttiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (4).

Adipoz dokudan elde edilen stromal vasküler fraksiyon (SVF); preadiposit, fibroblast, endotel hücreleri ve kök hücrelerini içerir. SVF, deneysel ve klinik çalışmalarda birçok patoloji üzerinde denenmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (5). Bu çalışmada streptozotosin ile diyabetik hale getirilen sıçanlarda, inguinal yağ dokusundan elde edilmiş SVF, siyatik sinir üzerine enjekte edilerek sinir rejenerasyonuna etkisi araştırıldı. SVF'nin siyatik sinir üzerine etkinliği, fonksiyonel olarak yürüme yolu analizi, elektrofizyolojik olarak elektromiyografi (EMG) ve histopatolojik olarak ışık mikroskopu ile incelendi.

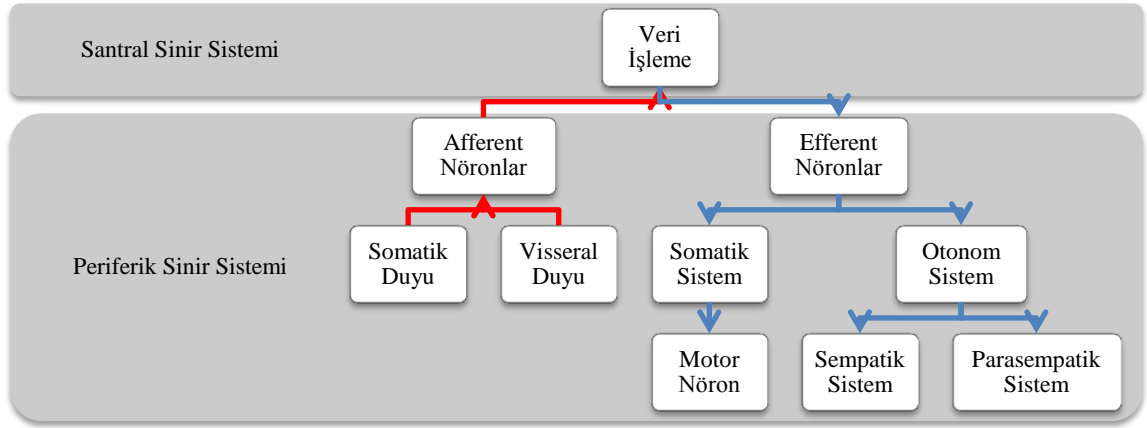
## 1.2 Sinir Sistemi Organizasyonu

Sinir sistemi, santral ve periferik sistem olmak üzere iki bölümde incelenmektedir. Santral sinir sistemi beyin ve spinal korddan; periferik sinir sistemi beyin ve spinal kord dışında kalan duyu ve motor nöronlarından oluşur (Tablo 1).



Tablo 1: Sinir Sistemi Yapısı

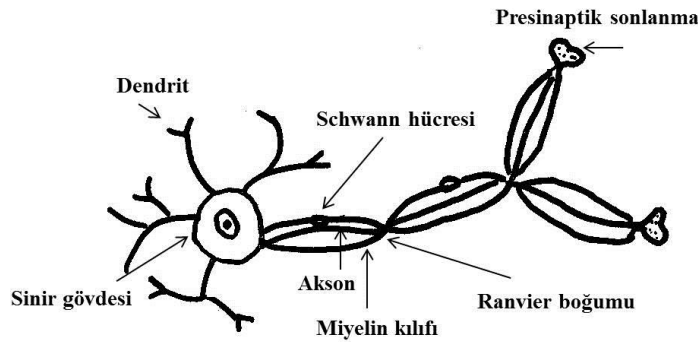
Dokunma, basınç, ağrı, sıcak-soğuk gibi duylular, kaslar ve eklemlerden gelen hareketler somatik afferent sinirler ile organlardan gelen koku ve tat gibi özel duylular visseral afferent sinirler ile periferik sinir sisteminden santral sinir sistemine taşınır. Santral sinir sisteminde işlenen veriler efferent sinirler ile vücuda iletilir. Somatik efferent sinirler çizgili kaslara gider ve sinir kas kavşağında sonlanır. Otonom efferent sinirler ise kalp kasını, organlardaki düz kasları, damar duvarını, kıl köklerini, sindirim sistemi bezleri ve ter bezlerini innerve eder (Tablo 2).



Tablo 2: Sinir Sistemi Organizasyonu

### 1.3 Periferik Sinir Anatomisi

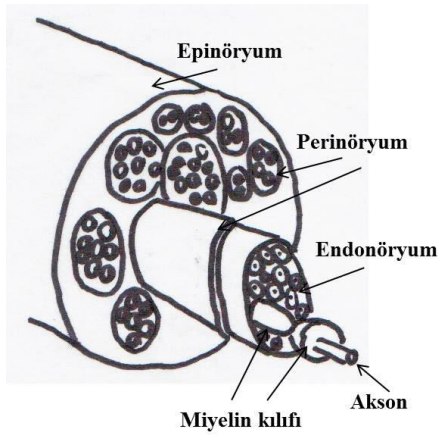
Sinir sistemi nöronlardan ve glia adı verilen destek hücrelerinden oluşur. Nöronlar gövde, akson, dendrit ve sinaptik terminal olmak üzere dört bölümden oluşur. Nöronun gövdesinden akson ve dendrit olmak üzere iki uzantı çıkar. Dendritler diğer nöronlarla bağlantı kurarken, aksonlar gövdeden gelen uyarıların diğer nöronlara ve organlara iletilmesini sağlar. Aksonların bir kısmı santral sinir sisteminden çıkarak periferik sinirleri oluşturur (Şekil 1).



Şekil 1: Nöronun Yapısı

Periferik sinir sisteminde endonöriyum adı verilen bağ dokusu aksonu sarar. Birkaç yüz akson birlikte perinöriyum ile sarılarak sinir demetlerini (fasikül) oluşturur.

Birkaç fasikül bir araya gelerek periferik siniri oluşturur. Periferik sinirin en dışında epinöryum adı verilen bağ dokusu vardır (Şekil 2).



Şekil 2: Sinir Lifinin Yapısı

Büyük çaplı aksonlar miyelin kılıfı adı verilen ve aksonda iletim hızını arttıran bir kılıf ile sarılıdır. Bu kılıf periferik sinir sisteminin glial hücresi olan Schwann hücrelerinin uzantılarıdır.

#### 1.4 Periferik Sinir Sistemi Yapısı

Motor nöronlar santral sinir sisteminden köken alarak, spinal kordun ön boynuzuna doğru uzanır. Ön boynuz seviyesinde spinal korddan çıkıp periferik sinirlerle hedef organları innerve eder.

Duyu nöronları spinal kordun dışında yer alan dorsal kök ganglionlarından köken alır ve hedef organları innerve eder. Duyu nöronlarının alt grupları tabloda belirtilmiştir (Tablo 3).

Lif Tipi	Boyut	Modalite	Miyelinizasyon
A-alfa (I)	13-20 mikrometre	Propriosepsiyon	Var
A-beta (II)	6-12 mikrometre	Propriosepsiyon, vibrasyon, basınç	Var
A-delta (III)	1-5 mikrometre	Keskin ağrı	Var
C (IV)	0.2-1.5 mikrometre	Termal ağrı, yanma	Yok

Tablo 3: Duyu nöronlarının alt grupları

Otonom nöronlar sempatik ve parasempatik lifleri içerir. Preganglionik lifler santral sinir sisteminden çıkarak sempatik zincir veya sempatik gangliyonlardaki postganglionik nöronlarla sinaps yapar.

Periferik sinir sisteminde sinir lifleri içerdikleri nöronlara göre duyu, motor ve karışık lifler olarak sınıflandırılırlar. Duyu sinirleri duyu nöronlarından, motor sinirleri motor nöronlarından, karışık sinir ise duyu ve motor nöronlarını birlikte içeren liflerden oluşur.

### 1.5 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus, insülin hormonunun yetersiz salınımı veya insülinin etkisine direnç gelişmesi sonucu karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında bozulmayla seyreden bir hastalıktır (6). İnsülin hormonu bozuklukları sonucu hücrelerin glikoz alımı ve işleme bozulur, kan glikoz seviyesi artar. Temel olarak iki tip DM vardır (Tablo 4) (7). Tip 1 DM, (insülin bağımlı), insülin sekresyonunun bozulmasına; Tip 2 DM, (insülin bağımlı olmayan), dokuların insülin etkisine direnç göstermesine bağlı oluşur.

---

#### Diabetes Mellitus Sınıflandırması

---

I.	Tip 1 DM
II.	Tip 2 DM
III.	Diğer DM Tipleri
	A. Beta hücre fonksiyonlarını ilgilendiren genetik defektlere bağlı
	B. İnsülin etkilerini ilgilendiren genetik defektlere bağlı
	C. Ekzokrin pankreas bozukluklarına bağlı
	D. Endokrinopatilere bağlı
	E. İlaç ve kimyasallara bağlı
	F. Enfeksiyonlara bağlı
	G. Nadir immün nedenlere bağlı
	H. Diğer genetik sendromlara bağlı
IV.	Gestasyonel DM

---

Tablo 4: Diabetes Mellitus Sınıflandırması

DM komplikasyonları akut ve kronik olarak ikiye ayrılır. Akut komplikasyonlar, diyabetik ketoasidoz, hiperglisemik hiperozmolar koma, hipoglisemi gibi hayatı tehdit eden durumlardır (8). Kronik komplikasyonlar ise sürekli artmış kan glikozu ve bozulmuş karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının kan damarlarında yaptığı değişikliklerle oluşur. Damar içindeki endotel hücrelerinin aşırı glikoprotein üretmesi sonucu bazal membran kalınlaşır ve zayıflar. Anjiyopati, mikrovasküler ve makrovasküler olarak iki grupta incelenir (9).

Makrovasküler komplikasyonlar, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilidir. Koroner arter hastalığı, diyabetik miyonekroz, periferik arter hastalığı, serebrovasküler olay bu grup komplikasyonlara örnektir (9).

Mikrovasküler komplikasyonlar, mikroanjiyopatinin sebep olduğu bir grup hastalıktır. Diyabetik kardiyomiopati, nefropati, nöropati, retinopati, ensefalopati mikrovasküler komplikasyonlardandır (9). Gelişmiş ülkelerde diyabetik nöropati ve damar hasarının birlikte sebep olduğu diyabetik ayak ülserleri, travmatik olmayan ekstremitte amputasyonlarının en sık nedenidir (10). Yine gelişmiş ülkelerde diyabetik retinopati en sık görme kaybı sebebi, diyabetik nefropati en sık hemodiyaliz endikasyonudur (9).

## 1.6 Diyabetik Nöropati

Nöropati, sinir liflerinin progresif fonksiyon kaybı ile karakterizedir. Diyabetik periferik nöropati, DM'ye bağlı periferik sinir disfonksiyonu olarak tanımlanır. Nöropati, diyabetik hastaların %50'sini etkileyen, en sık görülen komplikasyondur (2). Bu komplikasyon, hastaların hayat kalitesini ciddi olarak düşürmektedir.

Diyabetik nöropati etiyolojisi multifaktöryeldir. Semptomların ortaya çıkması kan şekeri regülasyonunun yanı sıra, ileri yaş, kan lipid seviyeleri, kan basıncı, sigara kullanımı, uzun boy, alkol ve genetik gibi birçok faktöre bağlıdır (11). Patofizyolojide biyokimyasal, vasküler ve immünolojik faktörler rol oynamaktadır (2).

Biyokimyasal olarak polyol yolağı, glikolizasyon son ürünleri, oksidatif stres periferik nöropatiye yol açmaktadır.

**Polyol yolağı:** Sinir dokusu glikozun hücre içine alınması için insüline ihtiyaç duymaz. Buna bağlı olarak hiperglisemi sinirler içinde glikozun artmasına ve normal glikolitik

yolağın doyumuna ulaşmasına neden olur. Fazla glikoz polyol yolağına girer, aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz ile sorbitol ve fruktoza dönüşür. Sorbitol ve fruktoz birikimi, azalmış miyoinositol, azalmış membran Na/K ATPaz aktivitesi, artmış osmotik basınç, bozulmuş aksonal transporta sebep olarak sinirde harabiyete yol açar.

**Glikolizasyon son ürünleri:** Fazla glikozun protein, yağ ve nükleotidlerle yaptığı non-enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan glikolizasyon son ürünleri nöron bütünlüğünü ve onarım mekanizmalarını bozar.

**Oksidatif stres:** DM'de artmış serbest radikaller net olmayan bazı mekanizmalar ile siniri etkiler. Sinir iskemisi ve artmış glikolizasyon ürünlerine sebep olur.

Biyokimyasal olarak etkilenmiş sinirlerde endonöral ödem meydana gelir. Ödemli sinirler, tarsal tünel gibi anatomik olarak dar bölgelerde sıkışma hasarına daha açıktır. Bu durum literatürde “*double crush*” sendromu olarak tanımlanmıştır (12).

Vasküler patogeneizde hipoksi ve iskeminin periferik sinir damarlarında vaskülit benzeri değişiklikler yaptığı, bazal membran kalınlaşması ve endotel hücrelerin degradasyonu ile sinir hasarı olduğu gösterilmiştir (2).

İmmünolojik mekanizmada ise sinir çevresinde lenfosit infiltrasyonu, Tumor Necrosis Factor, Interlökin-6 gibi mediatörler gösterilmiş ve sinir hasarının bu immünolojik mediatörlere bağlı olabileceği belirtilmiştir (2).

Bu mekanizmaların sonucu, sinirde aksonal dejenerasyon ve segmental demiyelinizasyon oluşur.

Diyabetik nöropati önce uzun ve ince lifli (A-delta ve C) sinirlerini tutar. Şikayetler genellikle ekstremitelerin distalinden başlar. Diyabetik nöropati birçok duyu, motor ve otonom semptomu sebep olabilir (9).

**Duyusal semptomlar:** Genellikle eldiven-çorap tarzı olarak tanımlanan ekstremitelerin distalinde uyuşukluk veya ağrı, yanma, batma, kaşınma.

**Motor semptomlar:** Elde ince motor koordinasyonda azalma. Ayakta takılma, proksimal kas zayıflıklarına bağlı merdiven çıkmada, tırmanmada zorluk.

**Otonom semptomlar:** Kardiyovasküler (persistan sinüs taşikardisi, ortostatik hipotansiyon, aritmi), gastrointestinal (disfaji, karın ağrısı, bulantı/kusma, diyare, kabızlık), genitoüriner (idrar yaparken zorluk, cinsel fonksiyon bozuklukları), sudomotor (sıcak intoleransı, gustatuar terleme) problemler. Ekstremitelerde terlemenin kaybolması, kuru ve soğuk cilde bağlı fissürler ve enfeksiyonlar.

Diyabetik nöropatide semptomların yanı sıra, tanıya bazı testler yardımcı olur (13). Dokunma ve “pinprick” duyusu, titreşim testi, monoflaman ile yapılan koruyucu duyu testi, derin tendon refleksleri, tinnel bulgusu, kranial sinir muayenesi, cildin değerlendirilmesi nöropati tanısında kullanılır. Kan basıncı ölçümü ve elektrokardiyografi ortostatik hipotansiyon ve aritmilerin teşhisinde önemlidir. Sinir iletim çalışmaları nöropatinin lokalizasyonu ve karakterini belirler.

Diyabetik nöropati için değişik sınıflandırma sistemleri vardır. Genel olarak simetrik ve asimetrik nöropati olarak sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma dışında kullanılan Thomas sınıflandırması anatomik ve patofizyolojik bir sınıflandırmadır (14) (Tablo 5). Diyabetik nöropati klinik sınıflandırması ise semptomlara göre yapılmaktadır (Tablo 6)(15).

---

### **Diyabetik Nöropati**

---

1. Hiperglisemik nöropati (akut)

2. Yaygın simetrik polinöropati

Duyusal ve sensorimotor nöropati

Simetrik proksimal motor nöropati

Otonom nöropati

Akut ağırlı duysal nöropati

3. Fokal, multifokal nöropati

Kraniyal nöropati

Gövde ve ekstremitte nöropatisi

Asimetrik alt ekstremitte motor nöropatisi

4. Kronik inflamatuvar demiyelinizan polinöropati

5. Hipoglisemik nöropati

---

Tablo 5: Thomas Diyabetik Nöropati Sınıflandırması

Diyabetik nöropati, diyabetik ayağın en önemli sebebidir. Diyabetik ayakların %80'i diyabetik nöropati zemininde gelişmektedir (16). Ayakta otonom nöropatiye bağlı fissür gelişmesi sonucu cilt bütünlüğü bozular. Bozulan cilt bütünlüğü ve azalmış immünolojik cevap, bakteriyel enfeksiyonlara zemin hazırlar. Kemik üzerinde ve parmak aralarındaki his kaybı, yaraların farkedilmesini geciktirir. His kaybının başka bir



sonucu da “Charcot” deformitesi olarak adlandırılan ayak eklem bütünlüklerinin bozulmasıdır. Ağrı duyusunun kaybı ile ligamentlerde aşırı zorlama, effüzyon ve sinovit görülür. Ligamentlerin hasarı, eklemlerde instabiliteye sebep olur. Motor nöropatiye bağlı olarak ayak intrinsik kaslarında atrofiler görülür. Bu süreç sonucunda ayak arkları hasar görür, yürüme mekanikleri bozulur, ayakta yük dengeleri değişir. Yükün fazla olduğu yerlerde ülserasyon ve enfeksiyon gelişir ve bunların sonucunda gangren oluşur.

### **Diyabetik Nöropati Klinik Sınıflandırma**

N0	Nöropati yok
N1	Asemptomatik nöropati
N1a	Nöropatik testler bozuk
N1b	Nöropatik testler ve nörolojik muayene bozuk
N2	Semptomatik nöropati
N2a	Semptomatik nöropati, nöropatik testlerde bozukluk
N2b	N2a ve ayak dorsifleksiyon zayıflığı
N3	Özürlülüğe sebep olan polinöropati

Tablo 6: Diyabetik Nöropati Klinik Sınıflandırması

Diyabetik nöropati tedavisinde amaç, sıkı şeker kontrolünün yanı sıra, komplikasyonlar oluşmadan önce sinir hasarına neden olan sebeplerin engellenmesidir (17). Günümüzde diyabetik nöropati tedavisi daha çok semptomları azaltmaya yönelik olsa da sebebi ortadan kaldıracak veya ilerlemeyi durduracak tedavilere yönelik birçok çalışma mevcuttur. Medikal tedavide, polyol yolağını bloke eden aldoz redüktaz inhibitörleri, antioksidan maddeler kullanılmıştır (18, 19).

Diyabetik nöropatinin cerrahi tedavisi ilk kez 1992 yılında Dellon tarafından tanımlanan sinir dekompresyonu üzerine geliştirilmiştir (20). “Double crush” sendromuna bağlı olarak, DM’den biyokimyasal olarak etkilenmiş sinirler, anatomik olarak dar bölgelerdeki sıkışmalardan daha çok zarar görür (17). Anatomik olarak sıkışma bölgelerinin dekompresyonu ile hastaların ağrı ve uyuşukluk gibi nöropatik şikayetlerinin düzeldiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Cerrahi tedaviden en çok yarar gören hastalar, nöropatinin başlangıç aşamasında olduğu, ülser gelişmemiş hastalardır.

Nöropati tedavisinde literatürde büyüme faktörleri ve kök hücrelerle ilgili çalışmalar umut vericidir. Kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin nöropatik sinirlerin hasarını azalttığı, nöron rejenerasyonuna katkıda bulunduğu ve vaskülarizasyonu arttırdığı deneysel olarak gösterilmiştir ancak bu konuda insanlar üzerinde yayınlanmış bir çalışma yoktur (21).

### **1.7 Yağ Dokusu ve Stromal Vasküler Fraksiyon**

Adiposit adı verilen yağ hücreleri, diferansiye olmamış mezenşimal hücrelerden köken alır. Adipositler, yağ sentezi, depolanması ve salınımından sorumludur. Tamamen diferansiye olan adipositlerde hücre bölünmesi olmaz. İki tip adiposit hücresi vardır (7). Tek, büyük yağ tanesi içeren uniloküler adipositler beyaz adipoz dokuyu; çoklu küçük yağ taneleri içeren multiloküler adipositler kahverengi adipoz dokuyu oluşturur. Embriyolojik gelişimde, erken fetal dönemde preadipositler, epiteloid prekürsör hücreler halinde kahverengi adipoz dokuyu oluşturur. Bu olay primer yağ dokusu oluşumudur. Geç fetal dönemde ise fusiform prekürsör hücreler bağ dokusu içinde oluşarak beyaz adipoz dokuyu oluşturur. Bu sekonder yağ dokusu oluşumudur.

Beyaz adipoz doku, vücutta subkütan dokuda bulunur. Erkeklerde boyun, omuz, kalça, uyluk bölgesinde, ilerleyen yaşlarda ise abdominal bölgede yoğun olarak bulunurken, kadınlarda meme, kalça, uyluk bölgelerinde birikim gösterir. Her iki cinsiyette de abdominal kavite, omentum ve mezenterlerde görülür. Yağ dokusu bağ dokusu ile septalara ayrılır, bu septalar içinde zengin kapiller damar ağları ve nöronlar mevcuttur. Vücudun ısı yalıtımı, darbelere karşı koruma, endokrin regülasyon, kas sürtünmelerinin azaltılması ve vücut konturunun sağlanması gibi görevleri vardır.

Kahverengi yağ dokusu hayatın ilk 10 yılında beyaz adipoz dokunun bulunduğu her yerde bulunabilirken, ilerleyen yaşlarda böbrek ve suprarenal bölge, aort çevresi, boyun ve mediasten gibi derin bölgelerde bulunur. Adiposit mitokondrilerindeki yüksek sitokrom oksidaz içeriği nedeniyle kahverengi görünür. Vücudun ısı üretimini (termogenez) sağlar. Isı üretimi dışında bazal membran komponentleri, otokrin, parakrin ve endokrin hormonlar salgıladığı gösterilmiştir. Nöronlar adipositlerde sonlanır.

Adipoz doku adipositlerin yanı sıra pre-adiposit, post-adiposit, mezenşimal kök hücre, endotelial hücre, perisit, mast hücresi, makrofaj, fibroblast, retikülosit ve sinir

hücrelerinden oluşur. Dokuda bulunan mezenşimal hücreler yalnızca monopotent değil, multipotent de olabilir. Bu multipotent mezenşimal hücreler adipoz dokudan derive kök hücre olarak adlandırılır. Yapılan çalışmalarda 1 cm<sup>3</sup> adipoz dokuda 1 milyon adiposit, 1 milyon adipoz dokudan derive kök hücre, 1 milyon vasküler endotelyal hücre, 1 milyon diğer hücre (makrofaj, lenfosit, perisit, fibroblast vb.) saptanmıştır. Adipoz dokudan derive kök hücreler adipoz doku içinde genellikle perikapiller yerleşimlidir. Tüm insan hücreleri içinde beyaz adipoz dokudan elde edilen kök hücreler, en yüksek plastisiteye sahip hücrelerdir (5).

Adipoz dokudan derive kök hücrelerin klinik kullanımları ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Kök hücrelerin kondrojenik, osteojenik, miyojenik, kardiyojenik, vasküler, endokrin, hepatik ya da hematopoetik hücrelere dönüşebileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (5). Yağ dokusunun kolay erişilebilir bir doku olması, klinikte kök hücre çalışmalarını hızlandırmıştır. Bu doku, eksizyonla veya yağ aspirasyon işlemi ile elde edilebilir. Plastik cerrahide yaygın olarak yapılan yağ aspirasyon işlemi ile 200 ml aspirattan 0.1-1 milyar çekirdekli hücre elde edilebilir. Bu çekirdekli hücrelerin %10'unu adipoz dokudan derive kök hücreler oluşturur. Direk eksize edilen yağ dokusundan elde edilen kök hücre sayısı daha fazladır. Bunun nedeni kök hücrelerin damar çevrelerinde bulunması ve yağ aspirasyonu sırasında aspire edilmemesi olabilir.

Cerrahi olarak aspire edilen yağ dokusu iki bölümden oluşur. Üst tabaka yağ dokusunu içerir. Alt tabaka; kan, yağ emme işlemi öncesi cerrahi bölgeye verilen infiltrasyon solüsyonu ve doku kalıntılarıdır. Yağ dokusunu içeren üst tabakanın kollajenaz ile parçalanması ve santrifüjü sonrası, adipositler kök hücreleri içeren diğer hücrelerden ayrılır. Kök hücreleri de içeren bu hücre çökeltisi SVF olarak adlandırılır.

Yağ dokusundan SVF elde etme yöntemleri 1960'lı yıllarda Rodbell ve Jones öncülüğünde tanımlanmıştır (22). Çalışmacılar sıçan yağ yastıkçıklarını küçük parçalara ayırıp, hematopoetik hücreleri uzaklaştırmak için yıkadıktan sonra, doku parçalarını kollajenazla inkübe etmişler, dokuyu santrifüj ettikten sonra SVF elde etmişlerdir (22).

SVF heterojen bir hücre popülasyonudur. İçeriğinde; dolaşımdaki kan hücreleri, fibroblastlar, perisitler, endotelyal hücreler ve preadipositler bulunur. SVF içindeki kök hücrelerin immünofenotipi incelendiğinde kendine özgü adezyon ve reseptör molekülleri, yüzey enzimleri, ekstraselüler matriks ve iskelet proteinleri, stromal hücre fenotip

proteinlerinin ekspresyonu görülür (Tablo 7) (22). Bu immünofenotipin bilinmesi, spesifik proteinlerin immünomanyetik veya flow sitometrik yöntemlerle seçilerek heterojen SVF'den daha saf kök hücre elde edilmesi için önemlidir. Adipositten elde edilen kök hücreler ile kemik iliğinden elde edilen kök hücreler arasında %90 oranında benzerlik saptanmıştır (23).

<b>Antijen</b>	<b>Yüzey-Pozitif Antijen</b>	<b>Yüzey-Negatif Antijen</b>
<b>Adezyon molekülleri</b>	CD9 (tetraspan), CD29 (b <sub>1</sub> integrin), CD49 (a <sub>4</sub> integrin), CD54 (ICAM-1), CD105 (endoglin), CD166 (ALCAM)	CD11b (a <sub>b</sub> integrin), CD18 (b2 integrin), CD50 (ICAM-3), CD56 (NCAM), CD62 (E-selektin), CD104
<b>Reseptör molekülleri</b>	CD44 (hyalüronat), CD71 (transferrin)	CD16 (Fc reseptör)
<b>Enzimler</b>	CD10 (lösemi antijeni), CD13 (aminopeptidaz), CD73 (5'ekto-nükleotidaz), aldehit dehidrogenaz	
<b>Ekstraselüler matrix molekülleri</b>	CD90 (Thy1), CD146 (Muc18), kollajen tip 1 ve 3, osteopontin, osteonektin	
<b>İskelet molekülleri</b>	Düz kas aktin, vimentin	
<b>Hematopoetik</b>		CD14, CD31, CD45
<b>Kompleman kaskadı</b>	CD55, CD59 (pronektin)	
<b>Histokompetabilite</b>	HLA-ABC	HLA-DR
<b>Kök hücre</b>	CD34, ABCG2	
<b>Stromal hücre</b>	CD29, CD44, CD73, CD90, CD166	

Tablo 7: İnsan Adipoz Kökenli Kök Hücre İmmünofenotipi (22)

Yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin onarım ve rejenerasyon mekanizmaları ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (22). Elde edilen verilerden ilki kök

hücrelerin sitokin ve büyüme faktörü salarak konağın kendi kök hücreleri için ortam oluşturmasıdır. Benzer şekilde iskemik bölgeye nakledilen kök hücrelerin; antioksidan kimyasallar, serbest radikal temizleyicileri, şaperon ve ısı proteinleri sağlayarak hücre sağkalımını arttırdığı düşünülmektedir. Bu parakrin etkilerin dışında yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin, adiposit, kardiyomiyosit, kondrosit, endotel, miyosit, nöron, osteoblast gibi hücrelere diferansiye olduğu gösterilmiştir.

SVF ve kök hücrelerle ilgili yapılan deneysel çalışmaların yanı sıra, literatürde klinik çalışmalar da mevcuttur. Meme rekonstrüksiyonu sonrası deformitelerin düzeltilmesi, perianal fistüllerin ve fekal inkontinansın tedavisi, skar tedavisi, multipl skleroz ve amyotrofik lateral skleroz gibi nörolojik hastalıkların tedavisi, karaciğer sirozunda karaciğer rejenerasyonunun sağlanması, miyokard iskemisi tedavisi gibi çalışmaların olumlu sonuçları sunulmuştur (24).

### **1.8 Deneysel Hayvan Modelleri**

Deneysel hayvan modelleri, insana veya diğer hayvan türlerine benzer biyolojilerin ve davranışların araştırılması için kullanılır. Deneysel hayvan modelleri 5 gruba ayrılır (25).

1. Hastalıkların deney hayvanlarında spontan olarak olduğu modeller
2. Hastalıkların deney hayvanlarında kimyasal/cerrahi olarak oluşturulduğu modeller
3. Hastalıkların deney hayvanlarında genetik manipülasyonla oluşturulduğu modeller
4. Deney hayvanlarının belirli bir hastalığa dirençli olduğu negatif modeller
5. İnsanlarda karşılığı olmayan hastalıkları olan deney hayvanı modelleri

Deneysel hayvan modelleri ile araştırma yapılırken, deney hayvanlarına en iyi bakım sağlanmalı, en az sayıda deney hayvanı kullanılmalı, mümkünse deney hayvanları yerine alternatif modeller kullanılmalı, tüm yönetmelik ve kurallara uyulmalıdır (26).

### 1.8.1 Diyabetik Hayvan Modelleri

Deney hayvanlarında DM ilk kez 1880'li yıllarda Minkowaki tarafından köpeklerin pankreası çıkarılarak oluşturulmuştur (25). Günümüzde DM oluşturmak için medikal, cerrahi, genetik manipülasyon gibi birçok yöntem kullanılmaktadır.

Cerrahi olarak pankreası çıkarılmış sıçan ve fareler DM deneylerinde en sık kullanılan modellerdir (27).

Cerrahi pankreatektomi dışında pankreasta hasar oluşturan maddeler, DM ve komplikasyonlarını araştırmada değerli modellerdir. Alloksan, streptozotosin, vacor, dithizon, 8-hidroksikinolon, deney hayvanlarında diyabetojenik olarak kullanılan kimyasal maddelerdir. Kimyasallar haricinde diyetle indüklenen DM modelleri de mevcuttur (27).

Streptozotosin, *Streptomyces achromonges*'ten elde edilen nitrozüre derivativesidir. Geniş antibiyotik spektrumu ve antineoplastik aktivitesi vardır. Glikoz transportu, glukokinaz fonksiyonu ile ilgili yollarla etkileşimden ve DNA kırılmalarından sorumludur. Kemirici deney hayvanlarında tek yüksek doz (50-75 mg/kg) veya çoklu az doz (40mg/kg 5 gün) streptozotosin uygulaması, pankreasa toksik hasar vererek insülinopenik DM yaratır. Diğer kimyasal maddelere göre uzun yarılanma ömrü ve hiperglisemi süresi, düşük ketoasidoz ve mortalite riski, diyabetik komplikasyonların daha iyi gözlenebilmesi sebebiyle tercih edilir (25, 27).

Genetik manipülasyonla elde edilen deney hayvanları tip 1 ve tip 2 DM türlerinde yaygın olarak kullanılırlar. Tek gen, poligenik, transgenik mutasyonlarla insüline farklı şekilde yanıt veren, obez veya obez olmayan değişik soylar elde edilir (Tablo 8) (27).

<b>Tip 1 DM Deney Hayvanı Modelleri</b>	<b>Tip 2 DM Deney Hayvanı Modelleri</b>
Non-obez DM (NOD) fare	Ob/Ob fare
Bio breeding (BB) sıçan	Db/db fare
Long Evans Tokushima lean (LETL) sıçan	Fa/fa Zucker sıçan
KDP sıçan	Goto Kakizaki sıçan
LEW-iddm sıçan	KK fare

New Zeland beyaz tavşan	NSY fare
Keeshond köpek	OETF sıçan
Çin hamster	İsrail sand sıçan
Macacca nigra siyah maymun	Fat-fed sıçan
	CBA/Ca fare
	Torri sıçan
	New Zeland obez fare

Tablo 8: Diyabetik Deney Hayvanı Modellerine Örnekler

### 1.8.2 Diyabetik Nöropati Modelleri ve Nöropatinin Değerlendirilmesi

Deney hayvan modellerinde diyabetik nöropati dinamik ve ilerleyici bir seyir gösterir (28). Akut metabolik fazda sinir iletim hızı yavaşlar, hiperaljezi oluşur. Bu fazdaki belirti ve bulgular geri dönüşümlü olabilir. DM süresi ilerledikçe kronik yapısal değişiklikler ortaya çıkar.

Diyabetik nöropati oluşturmak için en sık streptozotosin ile diyabetik oluşturulmuş sıçanlar kullanılır (28). Tek doz uygulamasından sonra 270 mg/dl üzeri kan glikoz seviyesi DM olarak kabul edilir. Alodini ve sinir iletim hızında yavaşlama 2-4 hafta içinde oluşabilirken, sinirde yapısal değişiklikler 8-16 hafta içinde ortaya çıkabilir.

Deney hayvanlarında diyabetik nöropati tanısı koyabilmek için 2 veya 3 değerlendirmede kontrol deneklere göre istatistik olarak anlamlı sonuçlar elde etmek gerekir (28). Bu değerlendirmeler histopatolojik, elektrofizyolojik ya da davranışsal testler ile yapılır.

Diyabetik nöropati gelişen sıçanlarda histopatolojik olarak miyelinli lif sayısı azalır, lif yoğunluğu artar, akson/lif boyu oranı azalır. Miyelinli lif atrofisi akut ve kronik dönemdeki nöropati için karakteristiktir (29). Yeni çalışmalarda intraepitelyal sinir liflerinin saptanmasıyla daha doğru karşılaştırmalar ve sonuçlar elde edilmiştir (28).

Elektrofizyolojik çalışmalar diyabetik nöropati modellerinde sinir disfonksiyonunu ve uygulanan tedavinin başarısını gösteren önemli testlerdir (28). İletim hızları kas EMG'lerinde M ve H dalgaları ile ölçülür.

Davranış testleri; duyu kaybı, ağrı, parestezi, allodini gibi duyu disfonksiyonlarını saptamak için kullanılır (28). Bu testler içinde kimyasal ajanlar, basınç veya sıcaklık ile duyu stimülasyonu vererek deney hayvanında ayak çekme hareketini göstermek en sık tercih edilen yöntemlerdir. Ancak testleri uygularken deney hayvanına verilen stres ve deri kalınlığı gibi bazı anatomik özellikler nedeniyle tek bir davranış testi yanlış sonuçlar verebilir.

Deneyel modellerde periferik sinir analizi için kullanılan bir başka test ise yürüme yolu analizidir. Sıçan siyatik siniri ile hem motor hem duyu sinir fonksiyonu değerlendirilebilir (30). 1979 yılında Hruska et al. sıçanların yürüme paternlerini inceleyerek nörolojik hastalıkların araştırılması için yeni ve hızlı bir test tanımlamışlardır. 1982'de De Medinaceli et al. yürüme yolu ile elde edilen sıçan ayak izleri için siyatik fonksiyon indeksini kullanmıştır. Günümüzde birçok sinir fonksiyonu çalışmasında bu indeks kullanılmaktadır.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma; Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Kamu Hastaneleri Kurumu Ankara İli 1. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'nun 02.05.2012 tarih ve 2012/6 protokol numaralı onayı ile aynı hastanenin Deney Hayvanı Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Çalışmada ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen 44 adet 3-4 aylık Wistar cinsi albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 22-24 °C sıcaklıkta, 12/12 saat ışık döngüsünde, bir kafeste 4 sıçan olacak şekilde barındırıldı. Deney hayvanları, herhangi bir sıvı ve besin kısıtlaması yapılmadan standart sıçan yemi ve su ile beslendi.

Deney hayvanları rastgele seçilerek 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubu 8 sıçan, diyabetik deney grubu 36 sıçan olarak belirlendi (Tablo 9).

Diyabetik deney grubu olan 36 sıçana 24 saat açlık sonrası 50 mg/kg tek doz streptozotosin (Streptozocin, Sigma-Aldrich Co., USA) intraperitonel olarak uygulandı. Uygulamadan sonra sıçanlar kısıtlama olmaksızın beslenmeye devam etti. 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kandaki glikoz seviyesi 300 mg/dl ve üzeri olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Sıçanların kan glikoz seviyeleri haftalık olarak, glukometre (GlucLeader-yasee GLM-76, HMD Biomedical Inc., Taiwan) ile ölçüldü, 550 mg/dl üzerinde glikoz seviyesi olan sıçanlara 1 IU kristalize insülin subkütan olarak uygulandı.

Diyabetik olan deney grubu kendi içinde 4 gruba ayrıldı. Deneyin 8. haftasında sekiz adet sıçan, SVF elde etmek için kullanıldı. On adet sıçanın sağ siyatik sinirine SVF, diğer on adet sıçanın siyatik sinirine fosfat tamponlu salin (FTS) enjekte edildi. Sekiz adet sıçana ise herhangi cerrahi bir işlem veya enjeksiyon uygulanmadı.

EMG kayıtları ADInstruments PowerLab 8/30 (ADInstruments Pty Ltd., Australia) ile alındı. Elektriksel uyarının verildiği elektrotlar sıçanda popliteal fossaya yerleştirildi. Uyarının alındığı pozitif ve negatif elektrotlar ayakta 2. ve 3. web aralığına, toprak elektrodu ise ayak tabanında deri altına yerleştirildi (Resim 1). Tüm kayıtlar her iki bacadan alındı ve genel anestezi altında gerçekleştirildi. EMG kayıtları ile alınan veriler LabChart V8 (ADInstruments Pty Ltd., Australia) ile analiz edildi. Eşik değerler

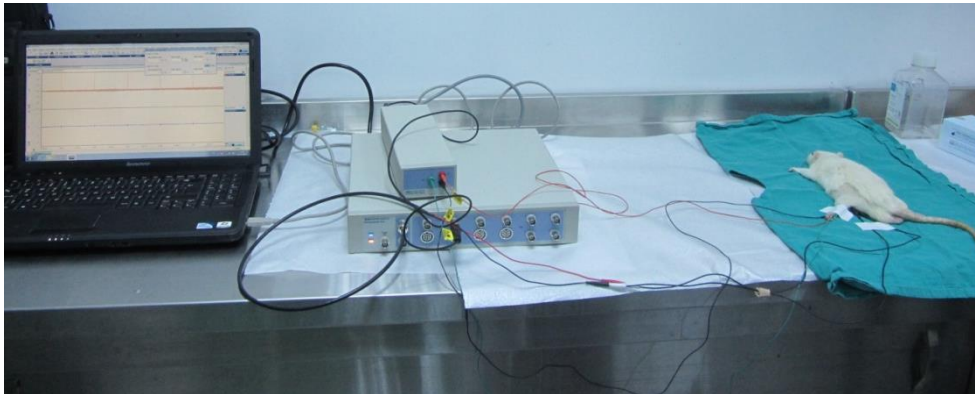
ve supramaksimal uyarı değerleri kaydedildi. EMG dalgalarının gecikme süreleri ve genlik değerleri ölçüldü.

		Deney Grupları*				
		1	2	3	4	5
0. Hafta	EMG	X		X	X	X
	Yürüme yolu analizi	X		X	X	X
	STZ enjeksiyonu		X	X	X	X
8. Hafta	EMG	X		X	X	X
	Yürüme yolu analizi	X		X	X	X
	SVF alma		X			
	Enjeksiyon				X	X
	Terminasyon		X			
12. Hafta	EMG	X		X	X	X
	Yürüme yolu analizi	X		X	X	X
	Terminasyon	X		X	X	X

Tablo 9: Deney Şeması

Deney Grupları\*

1. Kontrol grubu, n:8
2. Diyabetik sıçan, adipoz dokudan SVF elde edilen, n:8
3. Diyabetik sıçan, kontrol n:8
4. Diyabetik sıçan, siyatik sinire FTS enjekte edilen, n:10
5. Diyabetik sıçan, siyatik sinire SVF enjekte edilen, n:10



Resim 1: Elektromiyografi Kayıtları

Yürüme analizi, 8.2x42 cm boyutlarında, sonu karanlık kutuya açılan yol ile yapıldı (Resim 2). Ayak izleri beyaz fotokopi kağıdı üzerine mavi istampa mürekkebi ile alındı (Resim 3). Alınan ayak izlerinden ayak uzunluğu, ayak genişliği ve orta ayak genişliği hesaplandı. Ayak uzunluğu, topuktan 3. parmağa; ayak genişliği, 1. parmaktan 5. parmağa; orta ayak genişliği, 2. parmaktan 4. parmağa olan uzunluk ölçülerek belirlendi. Bu değerlerle siyatik fonksiyon indeksi hesaplandı (Şekil 3).



Resim 2: Yürüme Yolu

Resim 3: Sıçan Ayak İzi

$$SFI = -38.3 \left( \frac{DAU-NAU}{NAU} \right) + 109.5 \left( \frac{DAG-NAG}{NAG} \right) + 13.3 \left( \frac{DOAG-NOAG}{NOAG} \right) - 8.8$$

Şekil 3: Siyatik Fonksiyon İndeksi Formülü (30)

DAU: Deney yapılan ayak uzunluğu

NAU: Deney yapılmayan, normal ayak uzunluğu

DAG: Deney yapılan ayak genişliği

NAG: Deney yapılmayan, normal ayak genişliği

DOAG: Deney yapılan orta ayak genişliği

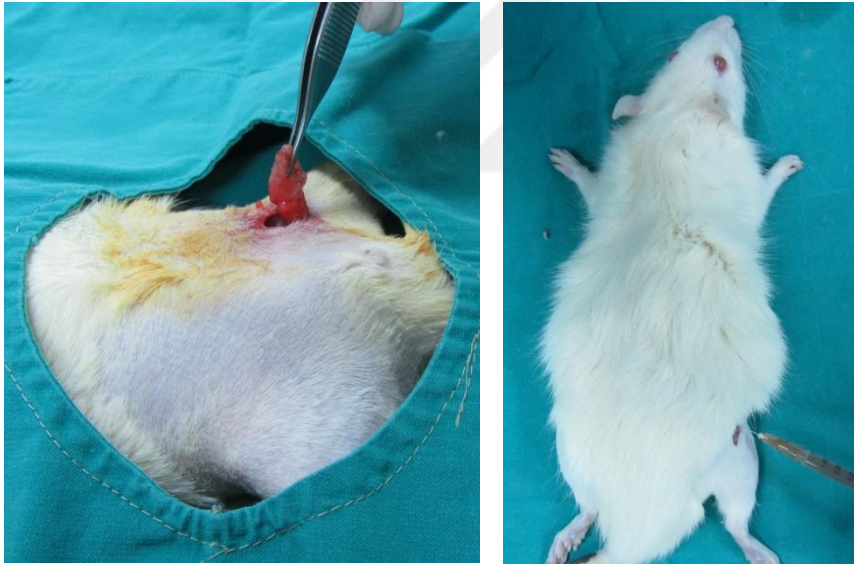
NOAG: Deney yapılmayan, normal orta ayak genişliği

EMG ölçümleri, cerrahi işlemler ve enjeksiyonlar genel anestezi altında yapıldı. Anestezi, intraperitoneal olarak uygulanan 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer, İstanbul), 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer, İstanbul) ile sağlandı.

Diyabetik olan 8 adet sıçan SVF elde etmek için kullanıldı. Genel anestezi altında, inguinal bölge tıraş edildikten sonra %10 povidon iyot ile saha temizliği yapıldı. Sıçanlar supin pozisyonda tespit edildi. İnguinal bölgeye yapılan oblik insizyonla inguinal yağ yastıkçığına ulaşıldı (Resim 4). Bilateral yağ yastıkçığı, derin inferior epigastrik arter bağlanarak eksize edildi.

Yağ yastıkçıkları 1-2 mm<sup>3</sup> parçalar haline getirilerek FTS (PBS, Sigma-Aldrich Co. USA) ile yıkandı. Yıkanan yağlara kollajenaz (Collagenase from *Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich Co. USA) uygulanarak 37°C'lik çalkalamalı inkübatörde 30 dakika bekletildi. Yeniden FTS ile yıkanan süspansiyon 600xg de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan süspansiyonda altta kalan kısım SVF olarak kullanıldı.

Deney gruplarına enjeksiyonlar, sıçanların dorsalinden biceps femoris ve gluteus maksimus kasları arasından sağ siyatik sinir lojuna yapıldı (Resim 5). Deney gruplarından ilkinde 0.5 cc FTS enjekte edilirken, ikinci gruba 0.5 cc SVF uygulandı.



Resim 4: İnguinal Yağ Yastıkçığının Diseksiyonu

Resim 5: Siyatik Sinire Enjeksiyon

Deney sonunda sıçanlar yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi. Bilateral siyatik sinirler patolojik inceleme için eksize edildi. Patolojik inceleme Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

Patolojik inceleme için eksize edilen sinirler %10'luk formaldehit içeren kaplara alındı. Mikroskopik inceleme için Luxol Fast Blue (Sigma-Aldrich Co. USA), Periodic acid-Schiff (Merck Millipore, Merck KGaA, Germany) ve Crystal violet (Merck Millipore, Merck KGaA, Germany) ile boyama uygulandı. Siyatik sinirler ışık mikroskobu altında miyelin kalınlığı, miyelin yapısı, sinir liflerinin sayısı ve çapı yönünden incelendi.

Bulguların istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics v20 (IBM, USA) ile yapıldı. Gruplar arası çoklu analizler için Kruskal Wallis testi; gruplar arası ikili analizler için Mann Whitney testi; grup içi haftalık değişimler için Wilcoxon testi kullanıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında incelendi.

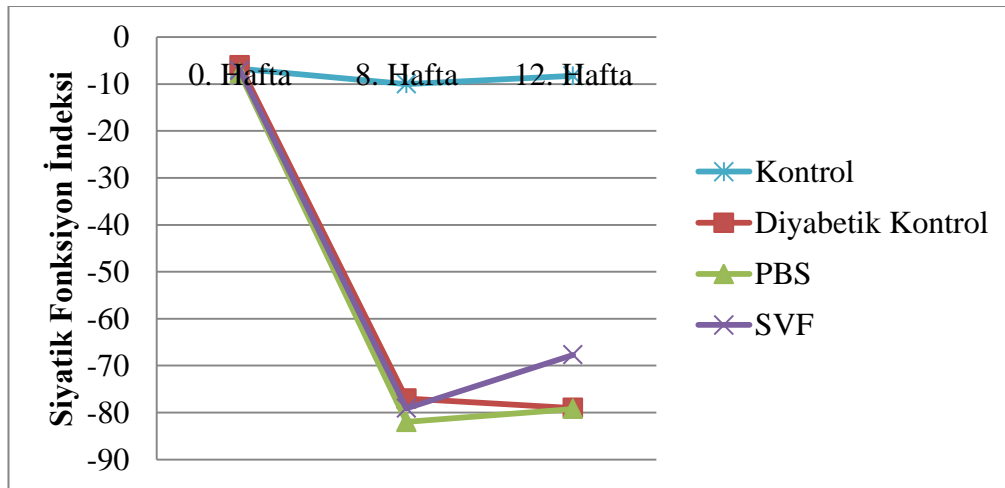


### 3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan sıçanlardan diyabetik kontrol grubunda olan bir sıçan ile deney grubunda FTS enjekte edilen bir sıçanda ayaklarda DM'ye bağlı kontraksiyon gelişti. Bu sıçanlar, yürüme yolu analizi ve EMG ölçümleri yapılamadığı için çalışma dışı bırakıldı.

#### 3.1 Yürüme Yolu Analizi

Kontrol grubu, diyabetik kontrol grubu, siyatik sinire fosfat tamponlu salin enjekte edilen FTS grubu ve siyatik sinire stromal vasküler fraksiyon enjekte edilen SVF grubunun 0., 8. ve 12. haftalardaki siyatik fonksiyon indeksi incelendi (Tablo 10). Kontrol grubunda haftalar arası fark saptanmadı ( $p=0.897$ ). Diyabetik kontrol grubu ve deney gruplarında ise 0. ve 8. haftalar arasında siyatik fonksiyon indeksi belirgin şekilde düşerken, diyabetik kontrol grubu ve FTS grubunda 8. ve 12. haftalar arasında fark görülmedi. SVF grubunda ise 8. ve 12. haftalar arasında siyatik fonksiyon indeksinin düzeldiği, bu düzelmeyi istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p=0.005$ ).



Tablo 10: Yürüme Yolu Analizi

Gruplar arası incelemede 0. hafta ölçümlerinde gruplar arası fark görülmedi. 8 haftada kontrol grubuna göre tüm diyabetik gruplarda belirgin düşüş görüldü, diyabetik gruplar arasında ise siyatik fonksiyon indeksi değerlerinin benzer olduğu görüldü (p=0.477). 12. haftada diyabetik kontrol ve FTS grubu arasında fark görülmezken, SVF grubu ile FTS grubu ve diyabetik kontrol grubu arasında anlamlı fark saptandı (p=0.001, p=0.003).

### **3.2 Elektromiyografi Analizi**

Yürüme yolu analizine benzer şekilde grupların 0., 8., 12. hafta, sağ ve sol bacaklarının EMG ölçümlerinden elde edilen genlik değerleri (amplitüd, mV), ve genlik süreleri (latans, ms) karşılaştırıldı. Tüm grupların haftalara göre sağ ve sol bacakları kendi arasında ve gruplar arasında değerlendirildiğinde sadece 12. Hafta ölçümlerinde SVF verilen grubun sağ bacağında latans değerinde diyabetik gruba göre anlamlı kısalma saptandı (p=0.009). Bu veri dışında kontrol ve diyabetik gruplar arasında da istatistiksel olarak fark görülmedi.

### **3.3 Histopatolojik Analiz**

Deneyin sonlandırılmasını takiben alınan siyatik sinirler miyelin kılıfı kalınlığı, miyelin defekti, lameller boşluklar, sinir lifi sayısı ve çapı açısından değerlendirildi. Miyelin kılıf kalınlığı 1-en ince, gevşek disorganize, 4- en kalın, yoğun, uniform, lameller olacak şekilde 1'den 4'e:

Miyelinde vakuoler defektler 0-yok, 4-en çok olacak şekilde 0'dan 4'e:

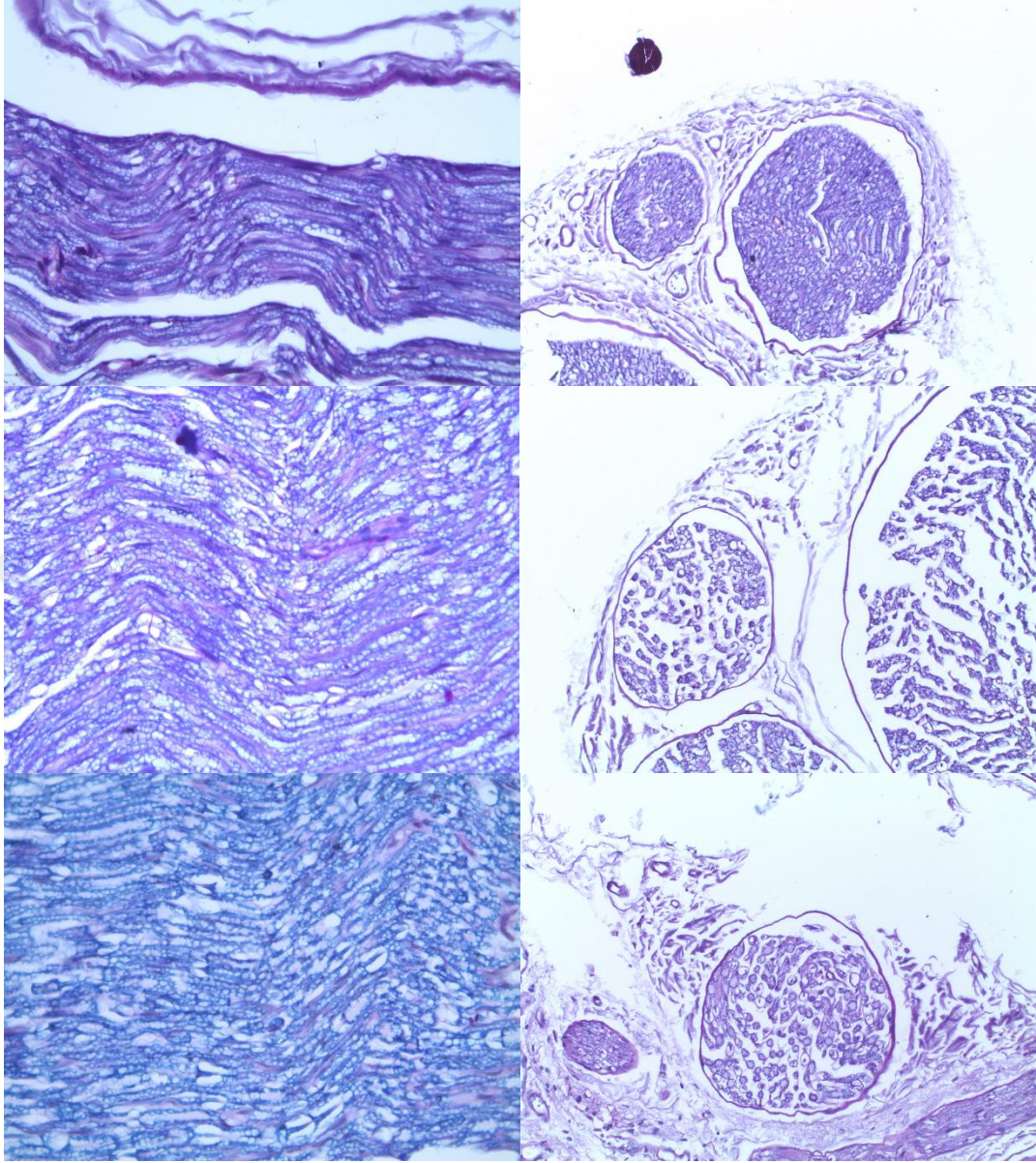
Lameller boşluklar 1-normal, 4-geniş, ayrılmış olacak şekilde 1'den 4'e:

Sinir lifleri 4-normal, en çok, 1-en az olacak şekilde 1'den 4'e kadar numaralandırıldı.

Kontrol grubunda miyelin lifleri benzer kalınlıkta ve oldukça uniform görünümdeydi. Miyelin liflerinde incelme, disorganizasyon, ayrılma, sinir liflerinin sayısı ve çaplarında azalma gözlenmedi. Miyelinde vakuolar defektler minimal olsa da tüm deneklerde izlendi. Bunun tespit ve takip sırasında olduğu düşünüldü. SVF grubunun sol siyatik sinirlerinde miyelin liflerinde orta şiddette hasar saptanırken, sağ siyatik sinirlerinde hafif-orta şiddette saptandı (Resim 6).

Tüm grupların istatistik olarak incelemesinde miyelin kalınlığının diyabetik gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı ( $p=0.01$ ) ancak sağ ve sol siyatik sinir arasında hiçbir grupta fark olmadığı görüldü. Diyabetik gruplar arasında diyabetik kontrol grubu ile FTS grubunun benzer kalınlığa sahip olduğu, ancak SVF grubunun sağ siyatik sinirinin diğer gruplara göre anlamlı olarak daha kalın olduğu saptandı ( $p=0.005$ ). Miyelinde vakuoler defektler tüm diyabetik gruplarda benzer şekilde izlendi. Lameller arasındaki boşluklar diyabetik kontrol grubu ve FTS grubunun her iki siyatik sinirinde de görülürken SVF grubunun sağ siyatik sinirinde hem sola göre hem diğer gruplara göre daha az görüldü ( $p= 0.016$ ,  $p=0.001$ ). Sinir liflerinin sayısı ve çapları tüm diyabetik gruplarda azalmış olmakla birlikte, lameller arası boşluğa benzer olarak, SVF grubunun sağ siyatik sinirinde hem sola göre hem diğer gruplara göre daha az belirgindi ( $p=0.011$ ,  $p=0.003$ ).





Resim 6: Histopatolojik Analiz, Luksol Fast Boyama

A: Kontrol grubu siyatik sinir, 400x, miyelin kılıfları normal, uniform.

B: Kontrol grubu siyatik sinir, 200x, sinir lifleri normal

C: SVF enjeksiyonu uygulanan diyabetik grup, SVF enjeksiyonu yapılmayan sol siyatik sinir, 400x, miyelin kılıfları incelmış, vakuoler defektler +

D: SVF enjeksiyonu uygulanan diyabetik grup, SVF enjeksiyonu yapılmayan sol siyatik sinir, 200x, sinir lifleri azalmış, incelmış

E: SVF enjeksiyonu uygulanan diyabetik grup, SVF enjeksiyonu yapılan sağ siyatik sinir, 400x, miyelin kılıfları incelmış ancak sol sinire göre daha uniform

F: SVF enjeksiyonu uygulanan diyabetik grup, SVF enjeksiyonu yapılan sağ siyatik sinir, 200x, sinir liflerinin çapı ve sayısı sol siyatik sinire göre daha fazla

#### 4. TARTIŞMA

Diyabetik ayağın en önemli komponenti olan diyabetik nöropati, önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. Erişkin hastalarda travmatik olmayan amputasyonların %60'ı DM nedeniyle yapılmaktadır. Tüm diyabetik komplikasyonlar arasında nöropati, en fazla hastaneye yatış sebebidir. Sık görülmesi ve yarattığı sorunların yanı sıra, nöropatinin spesifik bir tedavisi de bulunmamaktadır.

Diyabetik hastalarda görülen en sık nöropati tipi kronik sensörimotor distal simetrik polinöropatidir (9). Nöropatinin şiddeti hipergliseminin ciddiyeti ve süresine, kan glikoz seviyelerindeki dengesizliğe ve genetik yatkınlığa bağlı olarak değişir. Asemptomatik olabileceği gibi ağrı, karıncalanma, yanma gibi pozitif bulgular veya hissizlik gibi negatif semptomlar da görülebilir. Muayenede simetrik duyu kaybı, reflekslerin alınamaması, propriyosepsiyon duyusunun kaybı, kuru ve sıcak cilt, plantar kallus, parmaklarda pençeleşme, pes cavus ve ülserler saptanabilir.

Semptomlar ve bulgular ile birlikte kullanılan bazı testler tanıya yardımcıdır. Bu testler diyabetik hastalarda nöropati risk değerlendirmesi ve tarama testi olarak da kullanılabilirler (15). Klinikte en yaygın kullanılan test Semmes-Weinstein monofilaman testidir. Ayakta dört noktada basınç hissini ölçen testin sensitivitesi çeşitli çalışmalarda %86-100 arasında değişmektedir (15). Sıcak-soğuk testi, titreşim testi, pinprick testi klinikte kullanılan diğer testlerdendir.

Elektrofizyolojik testler, nöropatinin başlangıcı ve ilerleyişinin takibi için önemlidir. Elektrofizyolojik çalışmalar; objektif, parametrik, invaziv olmayan, güvenilir sonuçlar vermesine karşın kalın ve miyelinli sinir liflerindeki patolojileri göstermede daha başarılıdır. Bu testlerin en önemli amaçları diğer nöropatiler ile ayırıcı tanıda kullanılmalarıdır. Diyabetik nöropatide elektrofizyolojik çalışmalarda sinir iletim hızları, genlik, süre, alan ölçümleri, F-dalgaları ve uyarılabilirlik ölçülebilir. Nöropatide sinir iletim hızlarının yavaşlaması beklenir. Bu yavaşlamanın mekanizması sinir liflerinin miyelin yapılarında bozulma, sinir lifi çaplarında azalma, sinir liflerindeki iyon kanallarının bozulması olarak sıralanabilir (15). Sinir iletim çalışmaları nöropatinin başlangıcı, seyri ve subklinik nöropati hakkında bilgi verir. Genlik ve alan ölçümleri ile miyelinli lif yoğunluğu arasında güçlü bir korelasyon mevcuttur (15). Genlikte 1 mV düşme, 200 lif/m<sup>2</sup> düşüşü gösterir. Motor liflerden ön boynuza doğru ters uyarının geri

dönüp distalde yarattığı yanıtın bir göstergesi olan F dalgası, aksonal polinöropatilerde minimal gecikme gösterir. Bu dalga da literatürde sensitif ve güvenilir bir test olarak sunulmuştur. Bir başka gösterge olan uyarılabilirlik diyabetik nöropatilerde azalmıştır.

Nöropatide sural sinirden alınan biyopsi tanıya yardımcı olsa da invaziv bir yöntem olması, biyopsi alanında persistan ağrı ve soğuk intoleransına sebep olması nedeniyle tercih edilmez. Cilt biyopsisi, kütanöz sinirlerin morfolojik analizinde kullanılan, literatürde kabul görmeye başlayan bir testtir. Alınan 3 mm'lik cilt biyopsisi, her ne kadar invaziv olsa da elektrofizyolojik olarak saptanamayan küçük çaplı sinir patolojilerini göstermede yararlıdır (28).

Görüntüleme yöntemlerinden manyetik rezonans inceleme, spinal korddaki patolojileri saptar. Diyabetik nöropatide spinal kord alanında daralma, nöropatinin sadece periferik sinirleri tutan basit bir hastalık olmadığını göstermiştir (31). Korneadaki yüzeyel sinirlerin mikroskopla non-invaziv olarak muayenesi, sinir hasarı ve onarımı hakkında bilgi verebilir (32).

Diyabetik nöropatinin en önemli tedavisi kan glikoz seviyesinin uygun düzeyde tutulmasıdır. Glisemik kontrol ile nöropati ilerlemesi durdurulabilir (15). Semptomatik tedavide ağrılı nöropati için trisiklik ilaçlar, selektif seratonin geri alım inhibitörleri, antikonvülzanlar, opioidler ile topikal nitrat ve kapsaisin kullanılmaktadır.

Semptomatik tedaviler dışında bazı medikal ajanların nöropatiyi düzelttiğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu ajanlar arasında polyol yolağı inhibitörü olan aldoz redüktaz inhibitörleri ve antioksidan olan alfa lipoik asit hakkında literatürde randomize plasebo kontrollü çift kör çalışmalar mevcuttur (19). Esansiyel yağ asidi olan gama linolenik asit ve glikolizasyon inhibitörü olan aminoguanidin ile ilgili çalışmalar mevcuttur ancak bu ajanların tek başlarına nöropati hasarını geri çevirmede üstünlükleri gösterilememiştir (33).

Diyabetik nöropatinin patofizyolojisinde biyokimyasal yolakların sonucu olarak endonöral ödem olduğu bilinmektedir. Ödemli ve travmaya hassas sinirlerin anatomik olarak dar bölgelerden geçerken sıkışması ile sinir harabiyeti artmaktadır. Bu sebeplerle periferik sinirlerin bu anatomik sıkışma bölgelerinden serbestleştirilmesinin, nöropati semptomlarını klinik olarak azalttığı gösterilmiştir (17, 34). Cerrahi olarak üst ekstremitede ulnar ve median sinir, alt ekstremitede posterior tibial sinir ve dalları, peroneal sinir ve dalları serbestleştirilir. Cerrahi dekompresyonun sinirlerin

perinörotomisi ile kombine edildiği bir deneysel çalışmada sıçan yürüme yolu analizinin daha iyi düzeldiği belirtilmiştir (35). Sinir serbestleştirme işlemi en fazla Wagner 0 evresinde olan yani diyabetik nöropatisi olup ülser için riski artmış hastalarda faydalı olmaktadır (17). Ancak bu özelliklere sahip hastaları yakalamak oldukça zordur. Çünkü bu dönem hastalar tarafından farkedilmeden progresyon gösterebilir. Ayrıca ülkemiz şartları göz önüne alındığında sinir serbestleştirme işlemi yapmak için Wagner 0 hasta grubunun tanısını koymak ve hastaları tedaviye yönlendirmek daha da zordur. Dolayısıyla klinik pratiğimizde ileri evredeki hastalara sinir serbestleştirme yapmak zorunda kalınmaktadır. Elbette ki ülser oluşmuş hastalarda da serbestleştirmenin faydaları gösterilmiştir. Koruyucu duyunun geri kazanılması ve kanlanmanın artması ile yeni ülser oluşumu önlediği gösterilse de bu faydalar kısıtlıdır (36). Çünkü sıkışma ne kadar uzun süreli olursa serbestleştirme sonrası sinir iyileşmesi de o kadar az olmaktadır. Buradan yola çıkarak, serbestleştirmeye ek, sinir iyileşmesini arttırmak amacıyla, sinirlere kök hücreden zengin SVF uygulaması düşünüldü.

Kök hücre çalışmaları tıbbın her alanında olduğu gibi diyabetik nöropatide de yer bulmuştur. Diyabetik nöropatide mikroanjiyopati ve kompresyona bağlı iskemik olan sinirlerin besleyici maddelerden ve nörotrofik faktörlerden uzak kaldığı düşünülmektedir (37). Sinir büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü gibi nörotrofik faktörlerin ortamda bulunmaması sinir hasarının derinleşmesine sebep olmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda gen terapileri ve kök hücre nakillerinin nöropatiyi düzelttiği bildirilmiştir. Kordon kanından ve kemik iliğinden elde edilen endotelial progenitor hücrelerin diyabetik sıçanlara nakledilmesinden sonra siyatik sinirde kanlanmanın arttığı görülmüştür (38, 39). Bu kanlanma artışının vasküler endotelial büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, beyin nörotrofik faktör ve stromal hücre faktörü mRNA upregülasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Aynı etkiler periferik ve kemik iliği mononükleer hücrelerin naklinden sonra da gözlenmiştir (40).

Mezenşimal kök hücreler; kemik iliği, adipoz doku veya spinal ligamentlerde bulunabilir. Adipoz dokudan köken alan kök hücreler, matür adipoz dokunun içinde yer alan, herhangi bir hücre kültürü gerektirmeyen, kemik iliğinden elde edilen kök hücrelere göre daha az invaziv yöntemlerle elde edilebilen, daha az immünojenik hücrelerdir (37). Özellikle plastik cerrahi pratiğinde yaygın olarak yapılan yağ

aspirasyonu işlemi ile kolayca elde edilen, adipoz kökenli kök hücreleri içeren SVF klinikte kardiyovasküler hastalıklardan yüz gençleştirmeye kadar birçok alanda kullanılmaktadır (22, 41). Kök hücrelerin nakledildikleri ortamda nörotrofik faktörlerin salınımı, diferansiyasyon ve immünsüpresif etkileri ile doku onarımını gerçekleştirdikleri düşünülmektedir. Diyabetik nöropatide azalan nörotrofik faktörlerin yerine konması ve immünsüpresif etkileri sayesinde inflamasyonun azaltılması ile kök hücreler nöropatiyi tedavi etmek için kullanılabilir. Nöropatik sinirlerin çevresindeki hipoksik ortam, artmış inflamatuvar hücreler, kök hücrelerin nörotrofik faktör salınımını uyararak sinir rejenerasyonuna katkıda bulunmaktadır (21).

Literatürde, kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerle aksonal büyüme, anjiyogenez ve remiyelinizasyon ile nöropatik bulguların düzeldiği gösterilmiştir (42-45). Daha kolay ve daha fazla elde edilebilen, işlenmesi daha kolay olan adipoz kökenli kök hücreleri ile ilgili çalışmalar ise yaygın değildir. Çalışmamızda, bu bilgiler ışığında, adipoz kökenli hücreleri içeren SVF'nin diyabetik sıçanlarda nöropatiyi düzeltmede yardımcı olabileceği düşünüldü.

Deneyde kullanılacak SVF, Yoshimura ve arkadaşlarının tanımladığı yöntem modifiye edilerek elde edildi (46). Kontrol grubunda ise SVF elde ederken kullanılan FTS kullanıldı.

Deney planlamasında sıçanlar en sık kullanılan yöntem olan streptozotosin ile diyabetik hale getirildi. Günümüzde kullanılan hayvan modellerindeki diyabet komplikasyonlarının insanlardaki kronik süreci yansıtmayı yansıtmadığı tartışma konusudur. Ayrıca diyabetik nöropatinin heterojen klinik seyri de altın standart bir deneysel nöropati modeli oluşturulmasını engellemektedir. Yüksek, tek doz streptozotosin uygulama ile diyabetik nöropati daha erken ve daha ağır gelişir ancak mortalite oranı yüksektir. Düşük doz çoklu uygulamalarda ise nöropati insandaki kronik sürece benzerdir ancak nöropati düzeyi tek doz uygulamasına göre düşüktür (47). Çalışmamızda tek doz streptozotosin uygulandı, hiçbir deney hayvanında kayıp olmadı.

Deneysel modellerde nöropati tespitinde duyuşsal kayıp, elektrofizyolojik değişiklikler ve sinir lifinin anatomik değişikliklerinin gösterilmesi gerekir. Çalışmamızda EMG ile genlik ve gecikme süreleri ölçüldü. Fonksiyonel kaybın tespiti için yürüme yolu analizi yapıldı. Deney sonunda tüm grupların siyatik sinirlerindeki değişiklikler histopatolojik olarak incelendi.

Yürüme yolu analizi, deneyin başlangıcı, 8. hafta ve 12. haftasında tüm deney hayvanlarına yapıldı. Ucuz, kolay ve güvenilir bir yöntem olması, herhangi bir ağırlı uyaran olmaması nedeniyle bu test tercih edildi. Deney başlangıcında tüm grupların ve deney sonunda kontrol grubunun tüm ölçümlerin sonuçları tutarlıydı. Bu testin önemli sorunları arasında kemirici hayvanların nöropatiye bağlı kendi ayaklarını kemirmeleri, kontraktür gelişmesine bağlı ayak izi elde edilememesidir (48). Deneyimizde 2 sıçanda kontraktür gelişmesi üzerine, sıçanlar deney dışı bırakıldı. Yürüme yolu analizinde elde edilen sonuçlarda deney başlangıcı ve 8. hafta ölçümlerinde, diyabetik hayvanlarda özellikle ayak izi uzunluğunun arttığı görüldü. SVF uygulanan grupta 12. haftada siyatik indekslerinde düzelme istatistik olarak anlamlıydı. Ancak ölçülen değerler deney başlangıcındaki değerlere göre düşüktü. Tam düzelme olmamasına rağmen SVF enjeksiyonunun nöropatinin düzelmesine yarar sağladığı düşünüldü.

Deneyssel modellerde elektrofizyolojik çalışmalar yapılırken deney hayvanlarının yaşı ve ortam sıcaklığının kontrolü önemlidir. Miyelinizasyon maturasyonu sıçanlarda 3-4 aylıkken geliştiği için tüm sıçanlar aynı yaş grubundan seçildi. Ölçümler sırasında sıçanların sıcaklıkları sürekli monitorize edildi. Literatürde diyabetik hayvanlarda yapılan EMG’de genlik değerinde artma ve genlik süresinde uzama görülmüştür (47). Çalışmamızda diyabetik gruplarda 8. ve 12 haftalarda genlikte artma ve sürede uzama görülmesine rağmen istatistik olarak anlamlı sonuçlar elde edilemedi. Bunun sebebinin EMG ölçümlerindeki dış faktörler olduğu düşünüldü. Her ne kadar sıcaklıklar sabit tutulmaya çalışılsa da genel anestezi altında yapılan ölçümlerde standardizasyon mümkün olmadı.

Histopatolojik olarak sinirlerin incelemesinde miyelini boyayan luksol fast boyası kullanıldı. Sinir liflerinin sayısı ve çapında azalma, miyelin kalınlığında azalma, miyelin hasarı, tüm diyabetik gruplarda literatürle uyumlu olarak bulundu (29, 44, 49). SVF uygulanan siyatik sinirlerde hasarın daha az olduğu, miyelin kalınlığının normale yakın olduğu gözlemlendi. Bu bulgular diğer kök hücre çalışmalarında olduğu gibi SVF’nin sinir rejenerasyonuna pozitif etkisinin olabileceğini gösterdi.

Çalışmamızda SVF’nin diyabetik nöropatik sıçanlarda siyatik sinir üzerine gösterdiği olumlu etkilerinde SVF içindeki kök hücrelerle birlikte fibroblast, endotel gibi hücrelerin de katkısının olduğunu düşündük. Bu hipotezimizi doğrulamak için yüzey antijenleri ile yapılacak daha kapsamlı bir deneye ihtiyaç duyulmaktadır.

Mezenşimal kök hücrelerin naklinden sonra tümör oluşumu çeşitli çalışmalarda gözlenmiştir. Ancak bu tümör oluşumunun hücre kültüründe pasajlanan kök hücrelerin naklinden sonra olduğu bildirilmiştir (50). Çalışmamızda kullanılan SVF, herhangi bir hücre kültüründe çoğaltılmamıştır. Literatürde klinik uygulamalarda yağ hücrelerinden elde edilen kök hücrelerin güvenle kullanıldığına dair birçok yayın mevcut olsa da SVF'nin sinir rejenerasyonuna etkileri incelenirken tümör oluşumuna yol açıp açmadığı uzun süreli hayvan deneyleri ile test edilmelidir.

Plastik cerrahi pratiğinde diyabetik ayak ülserleri önemli bir yer tutmaktadır. Diyabetik nöropati, vasküler sorunlar ile birlikte ülserlere sebep olmaktadır. Kronik bir süreçte gelişen diyabetik nöropatiyi engellemek en iyi tedavi yöntemi olsa da, hastalar nöropatinin ileri evrelerinde hastaneye başvurmaktadır. Bu nedenle yeni tanı alan DM hastası multidisipliner olarak ele alınarak kan şekeri kontrolünün yanı sıra nöropati hasarlarından korunmak için önlem alınmalıdır.

Kompleks bir patofizyolojiye sahip olan diyabetik nöropatiyi tek bir ilaçla veya cerrahi yöntemle tedavi etmek mümkün görünmemektedir. Tüm hasar mekanizmalarına hakim olmak ve tedaviyi çok yönlü olarak planlamak ana hedef olmalıdır. Sıkı kan glikoz seviyesi kontrolü, antioksidan veya biyokimyasal yolların inhibisyonu ile birlikte zarar gören sinirlerin dekompresyonu ve rejenerasyona katkı sağlamak için kök hücrelerin sinirlere uygulanması tedavideki temel başlıkları oluşturmaktadır.

## 5. SONUÇ

Adipoz dokudan elde edilen kök hücreler, multipotent olmaları, parakrin ve immünmodülatör işlevleri ile rejeneratif tıpta önemli bir yere sahiptir. DM'ye bağlı komplikasyonlarda kök hücre uygulamaları tedavide fayda sağlayabilir. Diyabetik nöropati tedavisinde kök hücreden zengin stromal vasküler fraksiyonun sinir üzerine uygulanması, diğer medikal ve cerrahi tedaviler ile birlikte kombine edildiğinde morbiditeleri azaltabilir. Çalışmamızda yüz güldürücü sonuçlar elde etmemize rağmen SVF'nin uygulanabilirliği, etkinliği, etki süresi ve güvenilirliği ile ilgili deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.





## 6. KAYNAKLAR

1. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes research and clinical practice* 2011;94:311-321
2. Pasnoor M, Dimachkie MM, Kluding P, et al. Diabetic neuropathy part 1: overview and symmetric phenotypes. *Neurol Clin* 2013;31:425-445
3. Wattiez A, Barrière D, Dupuis A, et al. Rodent Models of Painful Diabetic Neuropathy: What Can We Learn from Them. *J Diabetes Metab S* 2012;5
4. Han JW, Sin MY, Yoon YS. Cell therapy for diabetic neuropathy using adult stem or progenitor cells. *Diabetes Metab J* 2013;37:91-105
5. Illouz Y-G, Sterodimas A. Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine. Springer; 2011
6. Guyton AC, Hall JE. Medical physiology. Saunders; 1961
7. Robbins SL, Kumar V, Abbas AK, et al. Robbins basic pathology. Elsevier Health Sciences; 2012
8. Fishbein H, Palumbo P. Acute metabolic complications in diabetes. *Diabetes in America* 1995;2:283-292
9. Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical diabetes* 2008;26:77-82
10. Sambamoorthi U, Tseng C-L, Rajan M, et al. Initial nontraumatic lower-extremity amputations among veterans with diabetes. *Medical care* 2006;44:779
11. Dorsey RR, Eberhardt MS, Gregg EW, et al. Peer Reviewed: Control of Risk Factors Among People With Diagnosed Diabetes, by Lower Extremity Disease Status. *Preventing chronic disease* 2009;6
12. Upton AR, McComas AJ. The double crush in nerve entrapment syndromes. *Lancet* 1973;2:359-362
13. Cornblath DR. Diabetic neuropathy: diagnostic methods. *Adv Stud Med* 2004;4:S650-661
14. Thomas P. Classification, differential diagnosis, and staging of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes* 1997;46:S54-S57
15. Boulton AJ, Malik RA, Arezzo JC, et al. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes care* 2004;27:1458-1486
16. Thorne CH. Grabb and Smith's plastic surgery. Lippincott Williams & Wilkins; 2013
17. Aszmann OC, Kress KM, Dellon AL. Results of decompression of peripheral nerves in diabetics: a prospective, blinded study. *Plast Reconstr Surg* 2000;106:816-822
18. Hotta N, Akanuma Y, Kawamori R, et al. Long-Term Clinical Effects of Epalrestat, an Aldose Reductase Inhibitor, on Diabetic Peripheral Neuropathy The 3-year, multicenter, comparative Aldose Reductase Inhibitor-Diabetes Complications Trial. *Diabetes care* 2006;29:1538-1544
19. Ziegler D, Nowak H, Kempler P, et al. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid: a meta-analysis. *Diabetic Medicine* 2004;21:114-121
20. Dellon AL. Treatment of symptomatic diabetic neuropathy by surgical decompression of multiple peripheral nerves. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:689-697; discussion 698-689

21. Davey GC, Patil SB, O'Loughlin A, et al. Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:86
22. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research* 2007;100:1249-1260
23. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-4295
24. Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Reviews and Reports* 2011;7:269-291
25. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, et al. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* 2009;23:245-258
26. Health NIO. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academies; 1985
27. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 2005;22:359-370
28. The Working Group of N, Biessels GJ, Bril V, et al. Phenotyping animal models of diabetic neuropathy: a consensus statement of the diabetic neuropathy study group of the EASD (Neurodiab). *J Peripher Nerv Syst* 2014
29. Yagihashi S, Kamijo M, Watanabe K. Reduced myelinated fiber size correlates with loss of axonal neurofilaments in peripheral nerve of chronically streptozotocin diabetic rats. *Am J Pathol* 1990;136:1365-1373
30. Varejao AS, Meek MF, Ferreira AJ, et al. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods* 2001;108:1-9
31. Eaton SE, Harris ND, Rajbhandari SM, et al. Spinal-cord involvement in diabetic peripheral neuropathy. *Lancet* 2001;358:35-36
32. Malik RA, Kallinikos P, Abbott CA, et al. Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients. *Diabetologia* 2003;46:683-688
33. Vinik AI, Park TS, Stansberry KB, et al. Diabetic neuropathies. *Diabetologia* 2000;43:957-973
34. van Maurik JF, van Hal M, van Eijk RP, et al. Value of surgical decompression of compressed nerves in the lower extremity in patients with painful diabetic neuropathy: a randomized controlled trial. *Plast Reconstr Surg* 2014;134:325-332
35. Sahin C, Karagoz H, Yuksel F, et al. The effect of perineurotomy on nerve regeneration in diabetic rats. *Plast Reconstr Surg* 2012;130:651e-661e
36. Hollis Caffee H. Treatment of diabetic neuropathy by decompression of the posterior tibial nerve. *Plast Reconstr Surg* 2000;106:813-815
37. Mizukami H, Yagihashi S. Exploring a new therapy for diabetic polyneuropathy - the application of stem cell transplantation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:45
38. Jeong JO, Kim MO, Kim H, et al. Dual angiogenic and neurotrophic effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy. *Circulation* 2009;119:699-708
39. Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, et al. Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes* 2005;54:1823-1828
40. Hasegawa T, Kosaki A, Shimizu K, et al. Amelioration of diabetic peripheral neuropathy by implantation of hematopoietic mononuclear cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Neurol* 2006;199:274-280

41. Gir P, Oni G, Brown SA, et al. Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 2012;129:1277-1290
42. Kim BJ, Jin HK, Bae JS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve the functioning of neurotrophic factors in a mouse model of diabetic neuropathy. *Lab Anim Res* 2011;27:171-176
43. Quertainmont R, Cantinieaux D, Botman O, et al. Mesenchymal stem cell graft improves recovery after spinal cord injury in adult rats through neurotrophic and pro-angiogenic actions. *PLoS One* 2012;7:e39500
44. Shibata T, Naruse K, Kamiya H, et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. *Diabetes* 2008;57:3099-3107
45. Wang Y, Xue M, Xuan YL, et al. Mesenchymal stem cell therapy improves diabetic cardiac autonomic neuropathy and decreases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Heart Lung Circ* 2013;22:1018-1025
46. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 2006;208:64-76
47. Erdoğan Ç, Ongun N. Deneysel Diyabetik Nöropati Modelleri. *Turkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics* 2014;7:22-28
48. Sarikcioglu L, Demirel B, Utuk A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia morphologica* 2009;68:1-7
49. Shi X, Chen Y, Nadeem L, et al. Beneficial effect of TNF-alpha inhibition on diabetic peripheral neuropathy. *J Neuroinflammation* 2013;10:69
50. Jeong JO, Han JW, Kim JM, et al. Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy. *Circ Res* 2011;108:1340-1347

## ÖZGEÇMİŞ

Berrak Akşam 1986 yılında Ankara'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2003 yılında girdiği Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2009 yılında mezun oldu. 2009 yılından beri Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniğinde asistan doktor olarak görev yapmaktadır.

